

FRANCO LOEB CHAZAN

**ANÁLISE DE EXPRESSÕES GÊNICAS DA MATRIZ
METALOPROTEINASE 3 e 10 NO TECIDO ENDOMETRIAL ANTES
E APÓS EMBOLIZAÇÃO ARTERIAL DE MIOMAS UTERINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção de Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

FRANCO LOEB CHAZAN

**ANÁLISE DE EXPRESSÕES GÊNICAS DA MATRIZ
METALOPROTEINASE 3 e 10 NO TECIDO ENDOMETRIAL ANTES
E APÓS EMBOLIZAÇÃO ARTERIAL DE MIOMAS UTERINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção de Título de
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Emilio Bonduki

Coorientadores: Prof. Dr. Mariano Tamura Vieira Gomes

Prof. Dr. Rodrigo de Aquino Castro

Dra Tatiana Bonetti

São Paulo

2019

Chazan, F.

Análise de expressões gênicas da matriz metaloproteinase 3 e 10 no tecido endometrial antes e após embolização arterial de miomas uterinos. / Franco Loeb Chazan – São Paulo, 2019.

x, 46f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: Gene expression analysis of extracellular matrix metalloproteinase 3 and 10 in endometrial tissue before and after the uterine leiomyoma artery embolization.

Palavras-chave: 1. Mioma do útero 2. Embolização Arterial de Miomas. 3. Matriz extracelular. 4. Metaloproteinase (MMP). 5. Embolização das artérias uterinas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
Departamento de Ginecologia

Chefe do Departamento:

Prof. Dra. Marair Gracio Ferreira Sartori

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

*Aos meus pais, Sergio e Michele,
respeito e gratidão pelo apoio e incentivo em todos os passos dessa minha vida.*

*À minha avó, Eugenia,
exemplo de vida.*

*Aos meus filhos Rafael, David e Eduardo,
definição de amor incondicional.*

*A Jacqueline,
companheira para todos os momentos.*

*Ao estudo contínuo,
única forma de evoluir,
única forma de se diferenciar...*

AGRADECIMENTOS

Às pacientes, pela assiduidade e esforço. Apesar das tantas dificuldades pessoais, demonstraram esperança, cumplicidade e tantos outros sentimentos que vivenciamos e dividimos durante nosso convívio.

Às funcionárias do Ambulatório do Mioma, que ajudaram e colaboraram em muito para a realização deste projeto e aos colegas do ambulatório, que acabaram se tornando um grupo único, com intuito da excelência no tratamento do mioma.

Ao Prof. Dr. Cláudio Emilio Bonduki, pela confiança em mim depositada e pelo esforço em realizar este projeto inovador para a UNIFESP.

Aos radiologistas intervencionistas Prof. Dr. Denis Szejnfeld e Dr. Vinicius Fornazari, dedicados e solícitos, com atuação impecável e sem a qual dificilmente este trabalho teria sido realizado.

Ao Prof. Dr. Mariano Tamura Vieira Gomes, pela amizade, apoio e a disposição em sempre ajudar.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Aquino de Castro, que muito me ajudou com conselhos e orientações.

À biomédica Dra. Tatiana Bonetti e Cristina Valletta de Carvalho, geneticista biomolecular, que com todo carinho e profissionalismo preparou, quantificou, purificou, colocou em gráficos e me ajudou em tudo o que precisei para realizar este trabalho. Agradeço toda sua atenção e torço por seu sucesso.

Ao Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão, pela atenção, carinho, retidão e ética, ofereceu-me a oportunidade de fazer meu doutorado pela EPM-UNIFESP.

Ao colega de turma e antes de tudo, amigo verdadeiro, Prof. Eduardo Schor, pelos seus mais sinceros conselhos e apoio nos momentos mais difíceis desta longa caminhada.

À colega e amiga Dra Kátia Franco Quaresma de Moura, com a qual iniciei esta jornada e, mesmo à distância, sempre esteve presente neste estudo.

À Regiane Poli G. de Assis, incentivadora incondicional para o desenvolvimento deste estudo.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Etiopatogenia.....	3
1.2 Tratamento.....	5
1.2.1 Embolização Arterial de Miomas.....	6
1.2.2 Receptividade Endometrial.....	9
1.3 Matriz Extracelular (MEC).....	9
2 OBJETIVOS.....	12
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	14
3.1 Casuística.....	15
3.1.1 Critérios de inclusão.....	15
3.1.2 Critérios de não inclusão.....	15
3.2 Métodos.....	16
3.2.1 Ressonância Magnética da Pelve (RM), com contraste endovenoso.....	16
3.2.2 Biópsia endometrial.....	16
3.2.3 Embolização arterial de miomas (EAM).....	17
3.2.4 Reavaliação pós-EAM.....	18
3.2.5 Amostra Tecidual.....	18
3.2.6 Extração e isolamento do ácido ribonucleico (RNA) em tempo real.....	18
3.2.7 Quantificação do RNA.....	19
3.2.8 Controle de Extração e Quantificação das Pacientes.....	19
3.2.9 Síntese e quantificação de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).....	20
3.2.10 PCR em tempo real.....	20
3.2.11 Análise Bioestatística.....	20
4 RESULTADOS.....	22
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÕES.....	34
7 ANEXOS.....	36
8 REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μm	Micra
cDNA	DNA complementar
COL	Colágeno
CQ	Ciclos de quantificação
CTFG	Fator de crescimento do tecido conectivo
EAM	Embolização de artérias de miomas
EAU	Embolização de artérias uterinas
HSP	Hospital São Paulo
MEC	Matriz Extracelular
MG	Microesferas gelatinosas
Min	Minutos
MI	Mililitro
MMP	Matriz metaloproteinase
Ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PG	Prostaglandina
PVA	Polivinil álcool
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
RQ	Quantidades relativas
Seg	Segundos
USTV	Ultrassonografia transvaginal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ilustração da Técnica de Embolização de Miomas Uterinos.....	7
Figura 2 –	Expressão normalizada dos genes MMP3 e MMP10 pré e pós-EAM.....	25
Figura 3 –	Expressão relativa dos genes MMP3 e MMP10 pré e pós EAM.	27
Figura 4 –	Expressão relativa para os genes MMP3 e MMP10 pós EAM....	28

RESUMO

Chazan F. Análise de expressões gênicas da matriz metaloproteinase 3 e 10 no tecido endometrial antes e após embolização arterial de miomas uterinos. São Paulo, 2019. Tese (doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

Introdução: a embolização arterial de miomas uterinos (EAM), também referida na literatura como embolização das artérias uterinas (EAU), é método terapêutico consagrado; porém, em pacientes com infertilidade ou com desejo futuro de gestação é tema controverso, pois gera preocupações quanto às modificações da biologia molecular do endométrio. Destacam-se expressões de genes da matriz extracelular (MEC) no endométrio, como as metaloproteinases, e, sua análise na segunda fase do ciclo carece de mais estudos. **Pacientes e Métodos:** foram avaliadas vinte mulheres com leiomiomas no ambulatório de ginecologia da UNIFESP. O termo de consentimento foi assinado e essas mulheres submeteram-se ao exame de ressonância magnética nuclear pélvica (RNM) e biópsia de endométrio entre o 20º e o 24º dia do ciclo menstrual pré-EAM e 6 meses pós-EAM. Realizada a extração de ácido ribonucleico (RNA), sintetizado o DNA complementar (cDNA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para análise dos dados foi utilizado o método comparativo Cq, também conhecido como método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para calcular as quantidades relativas (RQ) da expressão gênica entre as amostras. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. **Resultados:** observou-se uma diminuição de 9,52 vezes na expressão da MMP3 ($p:0,007$) e 2,59 vezes na expressão da MMP10 ($p:0,22$) nas amostras pós-embolização quando comparadas às amostras obtidas antes da embolização. **Conclusões:** foi identificada uma diminuição estatisticamente significativa para expressão do gene MMP3 pós-embolização. Não houve variação estatisticamente significativa para a MMP10.

Palavras-chave: Mioma do útero. Embolização das artérias uterinas. Matriz extracelular. Metaloproteinase (MMP). Embolização arterial de miomas.

ABSTRACT

Chazan F. **Analyzes of Gene expression of Matrix Metalloproteinase 3 and 10 in endometrial tissue before and after arterial embolization of uterine fibroids** (thesis). São Paulo, 2019: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

Introduction: Uterine Artery Embolization (UAE), also referred in the medical literature as Uterine Fibroid Embolization (UFE), is a well established therapeutic method for uterine fibroids. However, since there are some concerns about the endometrial integrity after this procedure, there have been several reports questioning this treatment for patients Who suffer from infertility or desire a future pregnancy. These studies believe that UAE could trigger modifications on the molecular biology of the endometrium, such as the gene expression of metalloproteinases during the luteal phase of the menstrual cycle, which analysis needs further investigation.

Material and Methods: Twenty women with uterine fibroids undertreatment in the gynecology office of the University of Sao Paulo werere cruited for UAE. Researchers requested magnetic resonance imaging (MRI) and obtained uterine tissue samples from all patients. Two samples were collected from each patient, both between the 20th and the 24th Day of their menstrual cycle, one before the uterine artery embolization and another six months after the procedure. It was performed the extraction of the ribonucleicacid (RNA), the synthesis of the complementary DNA (cDNA) and the real time polymerase chain reaction. The comparative Cq method, also known as $2^{-\Delta\Delta CT}$, was used for data analysis, used to calculate the relative quantities (RQ) of gene expression between the samples. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. **Results:** Comparing the samples collected before and after the embolization, it was observed a reduction of 9.52 times in the MMP3 expression ($p:0,007$) and 2,59 times in the MMP10 expression ($p:0,22$).

Conclusions: It was observed a statistically significant reduction of MMP3 gene expression after embolization. No statistically significant variation of MMP 10 gene expression was demonstrated in this study.

Keywords: Uterine Fibroid. Uterine Artery Embolization (UAE). Uterine Fibroid Embolization (UFE). Matrix Metalloproteinase (MMP). Arterial embolization of uterine fibroids.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia⁽¹⁾, o sangramento uterino anormal na menacme (excluindo as gestantes) pode ocorrer devido a causas estruturais e não estruturais, sendo responsável por grande número de consultas ginecológicas. Dentre as causas estruturais, os leiomiomas podem ser responsáveis por 20 a 40% das queixas de sangramento anormal nas mulheres em idade reprodutiva.^(2,3)

Leiomiomas uterinos são tumores benignos da musculatura lisa, que se desenvolvem a partir de células miométriais e quantidade aumentada de matriz extracelular, como fibronectina, proteoglicanos e colágeno, e estão cercados por uma camada fina de pseudocápsula de tecido areolar e fibras musculares comprimidas. Apesar de benignos, os miomas uterinos são responsáveis por altas taxas de morbidade nas mulheres na menacme, relacionadas principalmente a alterações menstruais, dor pélvica crônica, dispareunia, sintomas compressivos de órgãos vizinhos e à depender da localização, apresentam associação com infertilidade, abortamento habitual e parto pré-termo^(4,5), podendo comprometer a qualidade de vida das mulheres.

É o tumor pélvico mais frequente e sua incidência depende da população estudada, sendo relatada incidência de 5 a 80%, a depender do método diagnóstico. Em estudo utilizando ultrassonografia transvaginal em população não selecionada de mulheres entre 25 a 40 anos, foi observado incidência de 5,4%, sendo 3,3% entre 25-32anos e 7,8% entre 33-40anos, demonstrando influência da idade na prevalência do mioma do útero.⁽⁶⁾ Ao redor dos 50 anos, observa-se incidência cumulativa de 70% a 80%.^(7,8) Entretanto, a incidência elevada em alguns estudos pode estar relacionada à população selecionada, principalmente em pacientes com idade acima de 40 anos, ainda que muitas dessas pacientes sejam assintomáticas.⁽⁹⁾

Quando avaliada a indicação de histerectomia na população norte americana, foi observado que 51,4% foram decorrentes de fibromas sintomáticos.⁽¹⁰⁾ No Brasil, segundo o Sistema Informatizado de Internações do Ministério da Saúde, entre novembro de 2016 e dezembro de 2017 foram realizadas 107.293 histerectomias, sendo 58,2% decorrentes de leiomiomauterino.⁽¹¹⁾

1.1 Etiopatogenia

A etiopatogenia dos leiomiomas consiste na transformação dos miócitos normais em miócitos anormais, e o crescimento dos miócitos anormais em tumores clinicamente identificáveis. A etiologia dessas alterações ainda não está completamente estabelecida, sendo considerada multifatorial, correlacionada com fatores citogenéticos, hormonais, moleculares e fatores de crescimento da matriz extracelular ativa. É uma doença heterogênea de tal modo que os diferentes tipos de leiomiomas podem ter etiologias diversas.⁽¹²⁾

Dentre os fatores genéticos, pacientes da etnia negra apresentam risco 2 a 3 vezes maior do que as pacientes de etnia branca.^(12,9,13) Quanto ao histórico familiar, a presença de leiomioma em um parente de primeiro grau aumenta o risco em 2,2 vezes. Em relação ao fator individual, a menarca precoce (<10 anos versus >13 anos) e o IMC >30Kg/m² aumentam o risco respectivamente em 2,4 e 2,3 vezes.⁽¹²⁾

Destacam-se, dentro dos fatores protetores, o uso habitual de anticoncepcionais orais (razão de chance de 0,2), a multiparidade ou primeira gestação abaixo dos 25 anos e o tabagismo com mais de 19 anos de duração (razão de chance de 0,6).^(12,14)

No que se refere aos hormônios, estrogênio e a progesterona parecem ser os principais promotores de estímulo do desenvolvimento do leiomioma. Atuando diretamente sobre seus receptores e indiretamente agindo nas expressões gênicas dos fatores de crescimento e de apoptose.⁽¹⁵⁾ Os estrogênios podem atuar também como agente mitogênico, estimulando a proliferação da matriz extracelular (MEC), com aumento de colágeno e proteoglicanos. Além disso, a enzima aromatase (codificada pelo gene *CYP19*), responsável em converter androgênio em estrogênio, encontra-se com regulação aumentada no tecido tumoral em relação ao tecido adjacente. Esse fato é corroborado pela não identificação de leiomiomas em meninas pré-púberes e pela baixa incidência de adolescentes com diagnóstico dessa enfermidade.

Ademais, a presença de mutações somáticas e hereditárias são encontradas em muitos dos fibromas uterinos. As principais mutações ocorrem nos genes mediador subunidade 12 (*MED12*), *HMGA2* e *HMGA1*, fumaratohidroxilase (*FH*), colágeno tipo IV alpha-5 e alpha 6 (*COL4A6*).

Os fatores genéticos podem causar estímulo ou inibição sobre uma série de fatores hormonais e moleculares. Por exemplo, no nosso meio, a avaliação do polimorfismo PROGINS, que leva à diminuição da ação da progesterona no tecido alvo, revelou-se fator protetor para o desenvolvimento do leiomioma uterino.⁽¹⁶⁾

As queixas das pacientes estão relacionadas principalmente à localização do mioma. Os ciclos com sangramento anormal (aumento de fluxo e/ou duração) e, aqueles com perda total da ciclicidade, em geral, são causados por nódulos intramurais ou submucosos, enquanto os nódulos subserosos costumam não alterar os padrões menstruais.⁽¹⁷⁾

O diagnóstico de leiomioma uterino pode ser incidental, em exame de rotina ginecológica. Na maioria dos casos as pacientes são assintomáticas e o se beneficiam da conduta expectante. No caso de pacientes com sintomas, isto é, na presença de sangramento uterino anormal (SUA), algia pélvica menstrual ou não, sintomas compressivos ou infertilidade, a ultrassonografia transvaginal (USTV) se apresenta como ferramenta eficaz no diagnóstico.⁽¹⁸⁾

A ultrassonografia transvaginal é o método de escolha para o diagnóstico, devido à boa acurácia, alta sensibilidade (95-100%) e baixo custo.⁽¹⁹⁾ Histeroscopia, histerossonografia, histerossalpingografia, tomografia computadorizada e RM podem ser usados como técnicas complementares à USTV.⁽²⁰⁾ No entanto, esses outros métodos ficam limitados a casos específicos como, por exemplo, quando não é possível delimitar nódulos de grande volume. Nesses casos, a RM tem demonstrado maior acurácia para avaliação pré-cirúrgica.⁽²¹⁾

1.2 Tratamento

O objetivo do tratamento conservador do leiomioma uterino visa controlar os sintomas e retornar ou manter a capacidade reprodutiva, quando assim desejada. Dessa forma, a escolha da melhor opção terapêutica deve ser individualizada e depende do desejo reprodutivo da paciente, da sintomatologia apresentada, da localização e tamanho dos leiomiomas.⁽¹²⁾

A conduta pode ser expectante, clínica (medicamentosa), cirúrgica ou por meio da técnica de embolização arterial.⁽²²⁾ Apesar do leiomioma ser uma doença comum e importante em termos de saúde pública, é notável a falta de estudos que permitam conclusões definitivas sobre os benefícios de um tratamento sobre o outro, principalmente a longo prazo, e que possam subsidiar a escolha.⁽²³⁾

Pacientes assintomáticas se beneficiam da conduta expectante, principalmente se estiverem próximas da menopausa. O tratamento clínico tem a vantagem de não submeter a paciente aos riscos cirúrgicos e permite a preservação do útero. As principais medicações utilizadas são: anti-inflamatórios não hormonais, antifibrinolíticos, progestagênios, anticoncepcionais hormonais e análogos do hormônio liberador da gonadotrofina (aGnRH).⁽¹²⁾ Mais recentemente, os moduladores seletivos dos receptores de progesterona (SPMR), como o ulipristal, têm sido usados com sucesso.⁽²⁷⁾

O tratamento clínico é paliativo e é indicado para melhorar as condições clínicas das pacientes e/ou preparar para outra modalidade. O emprego dos aGnRH fica limitado a pacientes que necessitam de diminuição do volume uterino pré-cirúrgico e/ou controle da anemia, especialmente devido aos seus efeitos colaterais.⁽²⁴⁾

A conduta cirúrgica é a mais empregada para tratamento dos leiomiomas. Pode ser realizada exérese isolada dos fibromas, miomectomias, ou retirada do útero, histerectomias.⁽²⁵⁾

As miomectomias podem ser realizadas por laparotomia, videolaparoscopia ou histeroscopia. Pode ser empregada em mulheres com desejo reprodutivo, e tem maior taxa de sucesso quando os leiomiomas são submucosos ou intramurais e são pouco numerosos. No entanto, como toda técnica conservadora, não impede que novos nódulos possam se desenvolver.

Histerectomia é o tratamento que elimina definitivamente os sintomas e é indicada para pacientes com prole constituída, ou naquelas cujas demais técnicas conservadoras não apresentaram sucesso. Leiomiomas são a principal indicação de histerectomias nas mulheres norte americanas (Management of Uterine Fibroids. Summary, Evidence Report/Technology Assessment: Number 34. AHRQ Publication No. 01-E051, January 2001). No Brasil, os leiomiomas são responsáveis por aproximadamente 58% das histerectomias (DATASUS). As histerectomias podem ser realizadas por laparotomia, videolaparoscopia ou via vaginal.^(27,28) No entanto, as complicações associadas às histerectomias são fatores a se considerar. Segundo Lethaby et al.⁽²²⁾, estima-se 2 a 7% de complicações associadas à histerectomia, tais como infecções, fístulas, lesão vesical, lesão ureteral, lesão intestinal, deiscência de cicatriz, sangramento intraoperatório, aderências, algia pélvica, complicações anestésicas e até perturbações psicológicas decorrentes da retirada do útero.

1.2.1 Embolização Arterial de Miomas

A embolização das artérias uterinas (EAU) é um procedimento utilizado desde o final dos anos 1970 e a primeira publicação no tratamento do leiomioma uterino foi em 1995.⁽²⁹⁾ Também conhecida como embolização arterial de miomas (EAM), trata-se de uma terapia multidisciplinar (ginecologista, radiologista, intervencionista e anestesista), empregando-se técnica minimamente invasiva e para obstruir a irrigação dos tumores por meio de partículas em arteriografia e, conseqüentemente, controlar os sintomas e reduzir o tamanho tumoral preservando o útero. Em média ocorre melhora em 80 a 90% dos sintomas e o volume dos miomas são reduzidos em 40 a 50%; porém, recidivas também não são raras.⁽³⁰⁾

Revisão sistemática comparando EAM, histerectomia e miomectomia em uma metanálise com sete ensaios randomizados, demonstrou que as pacientes que se submeteram à embolização arterial de miomas apresentavam menor tempo de internação hospitalar e retorno mais rápido às atividades.⁽³⁰⁾ A melhora dos sintomas e a redução tumoral após o procedimento é significativa e a EAM é considerada opção terapêutica no tratamento dos leiomiomas uterinos em mulheres que apresentam contraindicação ao tratamento cirúrgico, risco cirúrgico elevado, difícil acesso cirúrgico ou falta de condições clínicas.⁽³¹⁾

A EAM apresenta vantagem sobre outros procedimentos, de tratar múltiplos leiomiomas simultaneamente, ser minimamente invasiva, e permitir o retorno precoce ao trabalho.^(32,33)

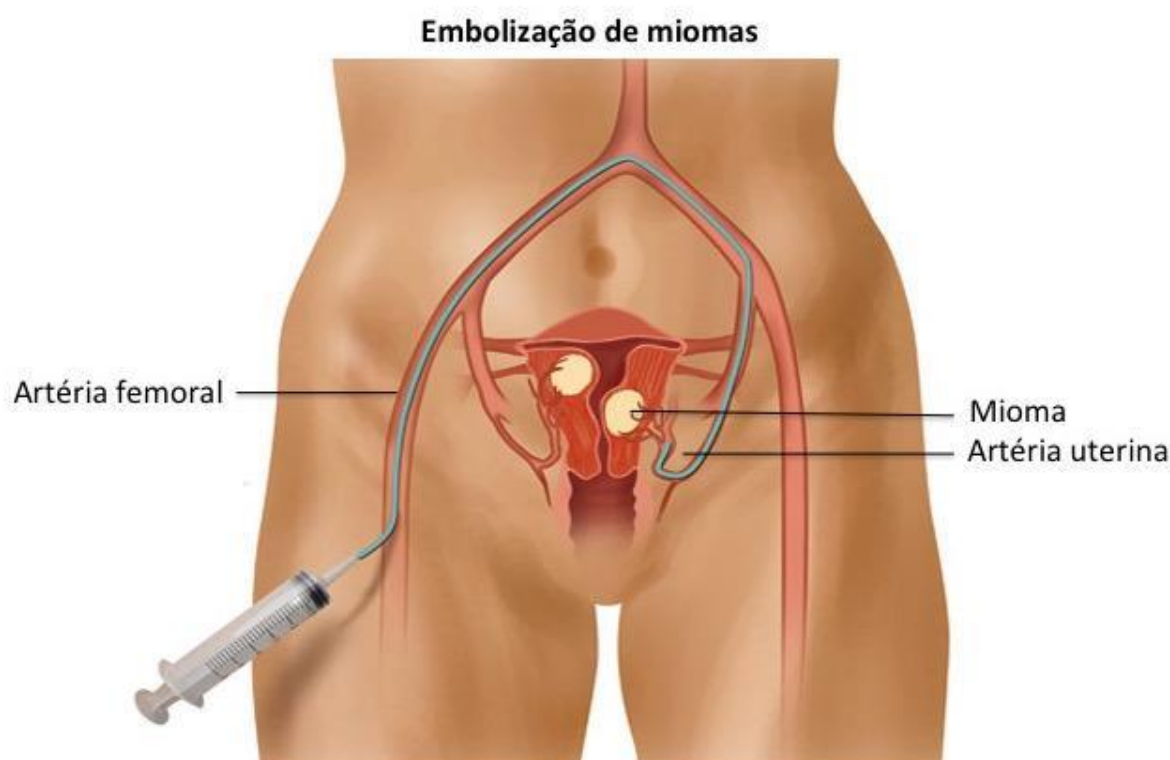


Figura 1 – Ilustração da Técnica de Embolização de Miomas Uterinos. (Imagem cedida pelo Dr. Claudio E. Bonduki)

Messina et al.⁽³⁴⁾, em 2002, descreveram melhora da menorragia e cólica menstrual em 90% das mulheres que se submeteram à embolização do mioma uterino com partículas de PVA. O volume uterino diminuiu em média 43,7% após um ano da EAM.

Diversos tipos de materiais embolizantes podem ser utilizados no território pélvico. Esses podem ser classificados principalmente conforme sua constituição e seu caráter permanente ou temporário. Utilizam-se cateteres não seletivos, cateteres com curva pré-formada, ponta hidrofílica, adaptados para o cateterismo seletivo da artéria ilíaca interna e uterina e ainda, microcatéteres para prevenção de espasmos vasculares (FEBRASGO - Manual de Orientação de Cirurgia Endovascular em Ginecologia e Obstetrícia, 2011).⁽³⁵⁾

No tratamento do mioma uterino, a escolha do agente embolizante é importante, pois a opção por agentes temporários resultará em recidiva da doença. Os agentes definitivos conhecidos e com menor repercussão inflamatória parecem ser as microesferas, sendo as de acrílico ou com núcleo de hidrogel as mais recomendadas. Deve-se sempre conhecer a anatomia e a presença de comunicações naturais entre o território arterial uterino e ovariano, definindo-se com cuidado o tamanho das partículas, a fim de evitar a migração indesejada. As dimensões mais utilizadas são de 500 a 700 e de 700 a 1000 micra, sendo possível, algumas vezes, associar agentes de menor e maior calibre no mesmo procedimento.

Entretanto, a EAM pode acarretar complicações como amenorreia persistente relacionadas à insuficiência ovariana ou à atrofia de endométrio e, em casos mais graves, levar à histerectomia por necrose.⁽³⁷⁾

Alterações no fluxo sanguíneo podem gerar mudanças morfológicas ou de função endometrial causadas pela insuficiência vascular.

Desse modo, Tropeano et al.⁽³⁸⁾, em 2010, reiteram a importância da avaliação do comportamento do endométrio frente à produção hormonal ovariana, viabilizando a ocorrência de futuras gestações.

1.2.2 Receptividade Endometrial

A preservação da integridade endometrial, mantendo o futuro reprodutivo da paciente submetida à EAM, sempre foi ponto de discussão e dúvidas. Está claro que a implantação do embrião humano requer uma interação coordenada entre o conceito e o endométrio. Embora há muito se conheça que esteróides ovarianos mediem esse processo, foi apenas nas últimas duas décadas que alguns fatores locais foram identificados. A regulação esteroidal das funções uterinas é mediada por fatores de crescimento e citocinas, bem como pela expressão de seus receptores.

Recentemente demonstrou-se interesse no entendimento da biologia molecular endometrial após a EAM.

Em nosso meio, Hilario et al., em 2012⁽³⁶⁾, avaliaram a expressão gênica relacionada à receptividade endometrial em pacientes submetidas à embolização do mioma uterino, concluindo que houve alteração da expressão dos genes LIF, IL-11 e Hoxa-11 (subexpressão) e que a expressão dos genes IL-6, claudina-4, Hoxa-10, receptor de estrogênio e receptor de progesterona no endométrio não se alterou de modo significativo após EAM. Tais achados não permitem concluir sobre o futuro reprodutivo das pacientes tratadas com EAM, visto que o mecanismo de interação entre embrião e endométrio, é multifatorial e complexo, assim como fatores compensatórios podem estar presentes nesse fenômeno.

1.3 Matriz Extracelular (MEC)

Alguns genes da MEC foram estudados e relacionados à reorganização endometrial, tais como proteínas da família matriz metaloproteínases (MMPs).

A MEC apresenta-se sob duas formas: matriz intersticial que preenche o espaço intercelular e a membrana basal mais especializada, que é uma fina folha subjacente ao epitélio.⁽³⁹⁾

As matrizes metaloproteinases (MMP) estão envolvidas na ruptura da matriz extracelular em processos fisiológicos, como o desenvolvimento embrionário, a reprodução e a remodelação tecidual. Degradação e remodelação da matriz extracelular é um evento chave na fisiologia da reprodução humana.⁽⁴⁴⁾

A remodelação da MEC, a qual é fundamental para a decidualização endometrial, assim como a implantação trofoblástica, é primariamente habilitada pelas matrizes metaloproteinases (MMP); essas enzimas compreendem um amplo grupo de endopeptidases zinco dependentes, as quais incluem collagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), estromelisinases (MMP3, MMP7 e MMP10) e gelatinases (MMP2 e MMP9). De uma forma equilibrada com seus inibidores naturais, as MMP são reguladoras essenciais da proliferação celular, apoptose e angiogênese.⁽⁴¹⁾

Foi observado em mulheres submetidas à estimulação ovariana controlada, seguido de suporte da fase luteal, superexpressão de genes da matriz metaloproteinase (MMP3, MMP9 e MMP10).⁽⁴⁰⁾

Durante a fase invasiva de implantação, trofoblastos e células do estroma decidual materno secretam produtos que regulam diferenciação trofoblástica e migração para dentro do endométrio materno. Interações parácrinas entre o trofoblasto extraviloso e a decídua materna são importantes para o sucesso da implantação embrionária, incluindo o estabelecimento de circulação placentária, ancoramento placentário na parede uterina e promoção de imunoaceitação de alografia fetal.

O abortamento espontâneo recorrente idiopático foi associado a anormalidades na remodelação da matriz extracelular, assim como alterações das expressões gênicas das MMPs no endométrio dessas mulheres e no vilo coriônico desses conceitos. Estudo avaliando polimorfismos das metaloproteinases demonstrou que polimorfismo dos genes funcionais MMP2-735 C/T e MMP9-1562 C/T podem estar associados ao aumento do risco de abortamento espontâneo recorrente idiopático.⁽⁴²⁾

Bernardo et al., em 2013⁽⁴³⁾, analisaram um painel de 86 genes de MEC e citocinas, encontrando superexpressão de MMP (1, 3, 10, 11 e 14) após 6 meses

de EAM, concluindo que as MMP, como de conhecimento, têm o papel de favorecimento na reorganização endometrial e proliferação celular; portanto, diante dos resultados pressupôs aceitável a hipótese de que não há piora na função endometrial após o procedimento.

Considerando os achados de literatura relacionando a expressão de determinados genes de matriz extracelular após a EAM, e a escassez de publicações determinando o que acontece com as expressões gênicas da MMP, sentimo-nos estimulados a propor o presente estudo.

2 OBJETIVOS

- Analisar a expressão gênica da matriz metaloproteinase3 (MMP 3) no endométrio de pacientes com leiomioma do útero, antes e após a embolização arterial de miomas (EAM).
 - Analisar a expressão gênica da matriz metaloproteinase10 (MMP 10) no endométrio de pacientes com leiomioma do útero, antes e após a embolização arterial de miomas (EAM).
-

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram selecionadas 19 mulheres no ambulatório de mioma uterino do Departamento de Ginecologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP), que se enquadravam nos critérios de inclusão deste protocolo de pesquisa. As pacientes analisadas apresentavam média etária de 36 anos (mínimo de 25 e máximo de 40 anos – DP de 4 anos), com volume uterino médio de 603 cc (mínimo de 155 e máximo de 1.600 cc, com DP de 374,2 cc).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP-UNIFESP) (CEP-1246/2011) (Anexo 1) e, após esclarecimentos sobre todas as opções terapêuticas disponíveis e consenso entre a equipe médica e a paciente, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado (Anexo 2).

3.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes entre 25 a 40 anos, com leiomioma uterino e:

- Sangramento uterino anormal e/ou;
- Dismenorreia e/ou;
- Dor pélvica e/ou;
- Desconforto urinário e/ou;
- Dispareunia profunda e/ou;
- Impossibilidade de outros tratamentos conservadores em pacientes sintomáticas com desejo de manutenção da capacidade reprodutiva.

3.1.2 Critérios de não inclusão

- Neoplasia genital e/ou;
 - Utilização de método contraceptivo hormonal e/ou;
-

- Utilização de hormônios para controle do ciclo e/ou;
- Gestação e/ou;
- Doença inflamatória pélvica aguda e/ou;
- Coagulopatia ou vasculopatias e/ou;
- Irradiação pélvica prévia e/ou;
- Nefropatia e hepatopatias.

3.2 Métodos

3.2.1 Ressonância Magnética da Pelve (RM), com contraste endovenoso

As mulheres se submeteram ao exame de RM com a finalidade de avaliar adequadamente os nódulos de mioma no tocante ao tamanho, número e localização, além de realizar o diagnóstico diferencial com adenomiose.⁽⁴⁵⁾

3.2.2 Biópsia endometrial

Realizada cuidadosa biópsia endometrial com cureta de Novak modificada, na segunda fase menstrual (fase secretória), entre o 20º e o 24º dias do ciclo menstrual, baseado na data da última menstruação e na média dos últimos ciclos menstruais de cada paciente. A coleta foi feita no próprio ambulatório de ginecologia, sem uso de analgesia.

A obtenção da amostra foi da seguinte forma: a) paciente em posição ginecológica; b) colocação de espéculo vaginal médio; c) antissepsia com Povidine® seguida de limpeza com gaze estéril para remoção de excedente; d) pinçamento de lábio anterior de colo uterino com pinça Pozzi; e) retificação de ângulo uterino e introdução delicada da cureta de Novak modificada até o fundo uterino; f) realização de vácuo com seringa de 20 ml acoplada à cureta; g) execução de movimentos delicados de curetagem para obtenção de material; h) retirado instrumental e hemostasia, quando necessário; i) retirado espéculo vaginal.

Cada paciente e sua respectiva amostra foram identificadas com um número de 1 a 19 e devidamente assinalado, na amostra obtida pré-EAM.

O material coletado foi estocado em temperatura -80°C até posterior extração de RNA.

3.2.3 Embolização arterial de miomas (EAM)

No momento da internação, as pacientes estavam em jejum oral de oito horas e foram administrados antibióticos (cefazolina 1g e azitromicina 1g) e anti-inflamatório (cetoprofeno 100mg) endovenoso uma hora antes do procedimento. As EAM foram realizadas na sala da hemodinâmica, localizada no andar térreo do Hospital São Paulo, sob anestesia peridural.

O procedimento consistiu em cateterização seletiva das artérias uterinas bilateralmente e injeção microesferas gelatinosas (MG) com diâmetros que variaram de 500 a 900 micras (μm). Após a injeção, as partículas deslocam-se para as regiões de menor resistência, no caso as tumorais, causando oclusão e isquemia em seu trajeto.⁽⁴⁶⁾

Encerravam-se os procedimentos quando o radiologista intervencionista notava diminuição do fluxo da injeção de contraste nas artérias uterinas com a imagem de “poda de árvore” ou “*endpoint*” pois, a partir desse momento, pode ocorrer comprometimento da microcirculação endometrial.

Atenção especial foi dada à possibilidade de embolização das artérias ovarianas, visto que, por vezes o fluxo sanguíneo predominante das gônadas se origina das artérias uterinas. Sabe-se que o diâmetro dos vasos ovarianos é, em média, de calibre menor que 500 μm e por isso, a utilização de partículas com tamanho maior, reduz o risco de oclusão desses vasos. Ao término do procedimento, realizou-se controle da dor com analgésicos e observação das pacientes na enfermaria da ginecologia do Hospital São Paulo (HSP). Após um ou dois dias, receberam alta hospitalar.

3.2.4 Reavaliação pós-EAM

Foi programada a reavaliação das pacientes após 7 dias da EAM, no ambulatório de mioma uterino, que tinha como objetivo a avaliação clínica pós-procedimento e orientações gerais, sendo agendada nova avaliação em seis meses da EAM. A reavaliação, em 6 meses consistiu em anamnese, exame físico, novo exame de RM e biópsia endometrial.

3.2.5 Amostra Tecidual

O material biológico utilizado neste estudo consiste em biópsia de endométrio de mulheres com mioma uterino, realizadas entre o 20º e o 24º dia do ciclo (janela de implantação), pré e pós-embolização endometrial. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

3.2.6 Extração e isolamento do ácido ribonucléico (RNA) em tempo real

A extração de RNA foi realizada utilizando o método do Trizol para tecido criopreservado. O material armazenado em microtubo foi retirado do freezer -80°C e acondicionado em papel alumínio, previamente autoclavado. O mesmo foi pulverizado (moído) por ação mecânica e mantido em nitrogênio líquido. Antes de descongelar, o macerado foi transferido para um microtubo contendo 1 mililitro (ml) de solução monofásica de fenol e isotiociano de guanidina (Trizol). Foram deixados por 15 minutos em temperatura ambiente e no vórtex por 15 minutos, conforme protocolo do fabricante. Foram adicionados 200 microlitros (µL) de clorofórmio e vórtex por 30 minutos; a seguir 3 minutos em temperatura ambiente e, então, centrifugados a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos a 4°C. A fase superior aquosa foi transferida para novos microtubos onde foram adicionados 500 µL de isopropanol e 10 µL de acetato de sódio 3M. Após serem homogeneizados por inversão, os microtubos foram mantidos em freezer -20°C “overnight”, para precipitação. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C; o precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 80%, colocado no vórtex por 2 minutos a

14.000 rpm e deixado para secar por 20 minutos. O RNA foi, então, dissolvido em 50 µL de água livre de RNase e armazenado a -80°C para futura análise.

3.2.7 Quantificação do RNA

A quantificação e a qualidade dos RNAs extraídos foram avaliadas por espectrofotometria, utilizando o equipamento Nanodrop (Nanodrop Technologies Inc., Rockland, DE) e a concentração foi expressa em ng/µL.

3.2.8 Controle de Extração e Quantificação das Pacientes

Número e Iniciais das Pacientes	Quantificação do RNA extraído - Amostras PRÉ		Quantificação do RNA extraído - Amostras PÓS	
	Concentração ng/µL	Razão 260/280	Concentração ng/µL	Razão 260/280
1) I.R.M.	76,1	1,77	266,1	1,89
2) T.S.	180,1	1,9	84,3	1,75
3) A.S.C.	2155,8	2,07	1158,1	2,04
4) L.F.	120,3	1,85	33,3	1,55
5) J.B.	261,4	1,92	583,1	1,96
6) G.G.	101,9	1,77	547,2	1,94
7) D.L	100,5	1,61	270,6	1,88
8) K.V.S.	141,2	1,89	122,4	1,90
09) R.C.S.	5310,6	2,07	3436,4	2,06
10) A.S.G.	343,7	1,86	312,9	1,97
11) I.M.S.	1464,7	2,03	738,4	1,97
12) M.F.S.S.	396,2	1,93	4249,2	2,07
13) A.J.C.	2490,9	2,03	4342,5	2,06
14) C.C.S.S.	134,7	1,95	2370,3	2,03
15) L.R.S.Q.	659,3	1,93	185,0	1,53
16) E.S.R.	392,7	1,98	1110,8	1,97
17) A.R.S.	191,8	1,96	3458,7	2,08
18) D.C.T.	265,9	1,97	1376,4	2,04
19) V.L. O.S.	458,6	2,06	2180,4	2,05

3.2.9 Síntese e quantificação de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA extraído utilizando-se protocolo do SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis kit (Invitrogen – Thermo Fisher). Os cDNAs obtidos de todas as amostras pareadas foram acondicionados em -20°C até a realização do protocolo de PCR em tempo real.

3.2.10 PCR em tempo real

Foram avaliadas 19 amostras pareadas, quanto à expressão gênica, utilizando método de PCR em tempo real pelo ensaio TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) com os oligonucleotídeos iniciadores descritos na literatura para os genes MMP3 (Hs00968305_m1) e MMP10 (Hs00233987_m1). Os genes BACTH (Hs99999903_m1) e GAPDH (Hs 02786624_g1) foram utilizados como normalizadores da reação por serem genes endógenos.

Foram utilizados 100ng de mRNA total para cada reação de PCR em um volume total de 25µL de acordo com o protocolo do fabricante. As condições de ciclagem foram as seguintes: 30seg em 48°C, 10min a 95°C e 50 ciclos de 15seg de desnaturação a 95°C e 60seg de anelamento a 60°C. Os valores de ciclos de quantificação (Cq) foram utilizados como ponto final, definido como o número de ciclos de PCR em que a fluorescência gerada pela amplificação atravessa o limiar. Três repetições por amostra foram executadas para garantir significância estatística. Para análise dos dados foi utilizado o método comparativo Cq, também conhecido como método $2^{-\Delta\Delta CT}$, para calcular as quantidades relativas (RQ) da expressão gênica entre as amostras.

3.2.11 Análise Bioestatística

Um total de 19 pacientes cederam suas amostras de biópsias de endométrio pré e pós-embolização. RNA foi extraído dessas amostras e foram feitos ensaios para expressão gênica por PCR em tempo real. Foram utilizados como controle os genes GAPDH e BACTH, bem como controles negativos de amplificação.

A média das triplicatas experimentais para expressão obtidas (Ct médio) foram utilizadas para a normalização de expressão ($\Delta Ct = Ct \text{ médio gene alvo} - Ct \text{ médio genes endógenos}$). Os valores de ΔCt das amostras pré e pós-embolização foram comparados pelo teste T-Student pareado. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 12 (Statsoft). Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. Os valores de expressão relativa entre os dois grupos foram calculados pelo método comparativo ($\text{Expressão relativa} = 2^{-(\Delta \Delta Ct)}$; onde $\Delta \Delta Ct = \text{média } \Delta Ct \text{ pós-embolização} - \text{média } \Delta Ct \text{ pré-embolização}$).

4 RESULTADOS

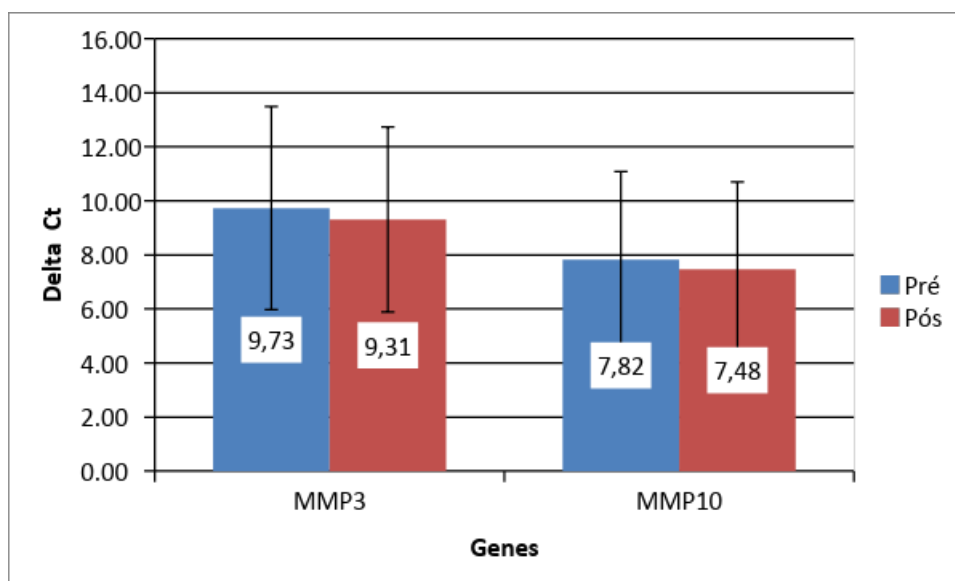
Os dados recebidos incluíam 19 pares de amostras (pré e pós-embolização). Na análise de dados foram excluídas todas as amostras que não tiveram amplificação, seja no grupo pré ou pós-embolização (deixando de perfazer um par), bem como as amostras que não amplificaram em pelo menos 2 poços de replicata (pois isso indicaria algum tipo de problema na amostra) e os *outliers* (amostras com diferença de amplificação de mais de 25% em relação à média das amostras). Diante disso, foram excluídos os dados das pacientes 2, 4, 8, 9, 10, 14, 15, 17 e 19 para a análise de MMP3 e 4, 6, 8, 13, 14 e 18 para a análise de MMP10. Ao final, o gene MMP3 incluiu 10 pares de amostras e o MMP10, 13 pares de amostras.

A tabela 1 ilustra a avaliação das concentrações obtidas no Nanodrop das amostras pareadas incluídas no estudo e que foram utilizadas no protocolo de conversão para cDNA proposto pelo kit SuperScript VILO (Invitrogen).

Tabela 1 – Valor de expressão para MMP3 e MMP10pré e pós-EAM

Amostras	MMP3		MMP10	
	Pré	Pós	Pré	Pós
1	8,91	5,75	7,13	5,32
2			5,45	7,95
3	13,14	12,08	9,65	9,99
4				
5	14,03	10,04	9,46	10,74
6	7,36	12,70		
7	12,99	6,17	13,00	7,47
8				
9			10,98	5,31
10			6,66	6,28
11	14,15	11,42	10,70	10,46
12	8,27	13,51	4,71	6,34
13	3,42	11,39		
14				
15			11,38	10,82
16	5,44	4,92	1,96	-0,33
17			5,73	5,93
18	9,61	5,14		
19			4,90	10,89
Média	9,73	9,31	7,82	7,48
Desvio Padrão	3,76	3,42	3,27	3,22
N	10	10	13	13
Expressão Relativa	1,34		1,27	
Valor P	0,793590		0,695253	

Como não houve diferenças estatisticamente significantes para os dados obtidos, foi feita uma busca de similaridade dentro dos grupos. As amostras 1, 3, 5, 7, 11, 16 e 18 parecem formar um grupo mais homogêneo. Como existia muita diferença no material de partida para a extração de RNA e essa diferença provavelmente se refletiu nos níveis de expressão, foram também feitas análises apenas com o grupo homogêneo. O número total de amostras homogêneas pareadas pré e pós-embolização foi de 7.



Legenda: Eixo y representa os valores de deltaCt (média do Ct do gene alvo – média do Ct dos genes endógenos), o eixo x tem as categorias pré e pós embolização para os genes testados – MMP3 e MMP10). As linhas verticais indicam o desvio padrão para cada uma das amostras.

Figura 2 – Expressão normalizada dos genes MMP3 e MMP10 pré e pós-EAM.

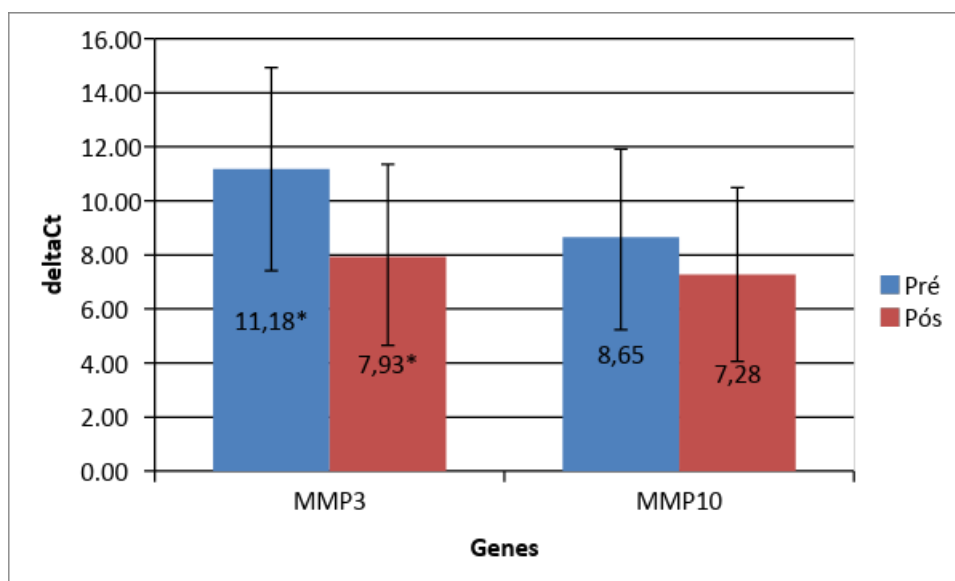
A tabela 2 indica os valores de expressão (deltaCt) observado dos genes que codificam para MMP3 e MMP10 nas pacientes do grupo homogêneo. Para cada um dos genes foi avaliada a expressão antes e depois da embolização. Estão também indicados os valores referentes à média e o desvio padrão, incluindo o número de pacientes indicado na linha “N”.

O valor de expressão relativa indica a diferença quantitativa de expressão de cada um dos genes (MMP3 e MMP10) quando comparados os tempos antes e depois da embolização. Observou-se uma diminuição de expressão (valores representados por sinal negativo) de 9,52 vezes para MMP3 e 2,59 vezes para MMP10 após a embolização, quando comparada à expressão pré-embolização.

Tabela 2 – Valor de expressão (delta Ct) para MMP3 e MMP10 nos dados da seleção

Amostras	MMP3		MMP10	
	Pré	Pós	Pré	Pós
1	8,91	5,75	7,13	5,32
3	13,14	12,08	9,65	9,99
5	14,03	10,04	9,46	10,74
7	12,99	6,17	13,00	7,47
11	14,15	11,42	10,70	10,46
16	5,44	4,92	1,96	-0,33
18	9,61	5,14		
Média	11,18	7,93	8,65	7,26
Desvio Padrão	3,28	3,12	3,79	4,27
N	7	7	6	6
Expressão Relativa (FoldChange)	-9,52		-2,59	
Valor P	0,006883		0,224870	

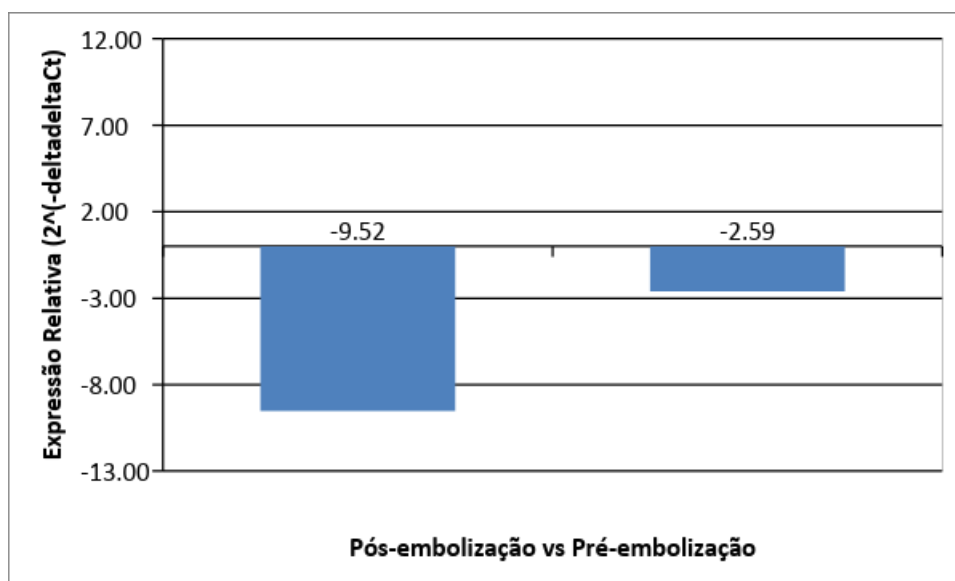
O gráfico da figura 3 indica os valores médios de expressão para os genes MMP3 e MMP10 antes e depois da embolização. Os números contidos dentro de cada uma das barras é o valor médio de expressão e as barras indicam o desvio padrão, que pode ser observado numericamente na tabela 1. Esse gráfico demonstra a variação na expressão dos genes MMP3 e MMP10 antes e depois da embolização. O valor de $p < 0,05$ indica o resultado com significância estatística, com 95% de confiança.



Legenda: Eixo y representa os valores de deltaCt (média do Ct do gene alvo – média do Ct dos genes endógenos), o eixo x tem as categorias pré e pós- embolização para os genes testados – MMP3 e MMP10). As linhas verticais indicam o desvio padrão para cada uma das amostras. *=P<0,05.

Figura 3 – Expressão relativa dos genes MMP3 e MMP10 pré e pós EAM.

O gráfico da figura 4 indica a diferença de expressão (expressão relativa / foldchange), quando se compara a expressão observada antes da embolização com aquela observada após a embolização. Os valores são negativos pois se observou uma diminuição de 9,52 vezes na expressão da MMP3 e 2,59 vezes na expressão da MMP10 nas amostras pós-embolização quando comparadas às amostras obtidas antes da embolização.



Legenda: Eixo y representa a diferença na expressão relativa entre os grupos pós-embolização ($2^{(-\text{deltadeltaCt})}$); o eixo x indica os genes testados – MMP3 e MMP10. $^* = P < 0,05$.

Figura 4 – Expressão relativa para os genes MMP3 e MMP10 pós EAM.

5 DISCUSSÃO

O contexto social e econômico atual da mulher, com postergação da gravidez, representa um novo desafio na condução de pacientes com leiomioma uterino.

Nesse contexto, vivenciamos situações de dificuldade em relação ao diagnóstico, condução clínica e proposta de novos tratamentos. A opção por tratamentos minimamente invasivos é uma tendência na medicina e vai ao encontro dos anseios e expectativas dos pacientes. Entretanto, a definição criteriosa e a escolha do melhor tratamento deve ser individualizada e proposta por profissional capacitado.

A literatura médica que avalia o tema proposto, mioma uterino, é repleta de dúvidas e falta de evidências científicas contundentes relacionadas à etiologia, quadro clínico, diagnóstico e tratamentos.

A real interferência dos miomas uterinos na capacidade reprodutiva ainda é uma incógnita nas mais qualificadas publicações.

A localização e posicionamento dos miomas no miométrio e sua relação com a cavidade uterina é de fundamental importância.

Assim, miomas submucosos apresentam potencial de infertilidade associada e a sua remoção é encorajada em pacientes com desejo reprodutivo.

Os subserosos, por sua vez, em nada afetam a capacidade reprodutiva e a remoção cirúrgica desses miomas somente deve ser proposta em casos de dimensões que justifiquem uma evolução pré-natal mais adequada.

As maiores discussões estão relacionadas aos miomas intramurais, sendo que cada caso deve ser individualizado.

Miomas com diâmetros maiores que 5 cm e que tangenciam a cavidade endometrial apresentam um potencial maior de infertilidade associada.

A miomectomia é a cirúrgica clássica para retirada dos miomas com preservação do útero e sua capacidade reprodutiva.

Pode ser realizada pela via histeroscópica, laparoscópica ou laparotômica, conforme localização, dimensões e habilidade do cirurgião.

Ravina et al.⁽⁴⁷⁾, descreve a EAM como alternativa terapêutica conservadora.

É uma opção para o tratamento conservador do leiomioma, pois trata de uma única vez múltiplos nódulos presentes no útero, é menos invasiva, é eficaz no controle dos sintomas e requer um período menor de afastamento das atividades profissionais. Entretanto, ainda é controverso o impacto dessa terapia sobre os aspectos morfológicos e funcionais do endométrio, devido aos relatos de endometrite ou pela eventual isquemia transitória desse tecido após o procedimento.

A possibilidade de infertilidade após a Embolização Arterial de Miomas (EAM) gerava discussões, até Ravina et al.⁽⁴⁸⁾, em 2001, afirmarem e demonstrarem posição contrária. Os casos devem ser selecionados e os casais devem ser informados dos riscos, assim como com qualquer terapêutica e o termo de consentimento livre e esclarecido deve ser elaborado.

Muitos dos processos moleculares endometriais ocorrem pela interação de componentes da matriz extracelular (MEC) e das metaloproteinasas (MMP) no decorrer do ciclo menstrual, especialmente na fase lútea. Eventuais alterações no fluxo endometrial em mulheres submetidas a EAM podem alterar a expressão gênica da MEC, promovendo mudanças na função reprodutiva desse tecido.

A temática principal da EAM é sobre seus possíveis efeitos no endométrio e quanto a possibilidade de dano à fertilidade. Por outro lado, gestações após o procedimento, melhora dos sintomas e a melhora dos recursos diagnósticos e terapêuticos impulsionou a técnica e criaram-se expectativas quanto à questão reprodutiva feminina. Do ponto de vista da manutenção da capacidade reprodutiva após EAM, vários estudos mostraram taxas de gravidez em torno de 30% após este tratamento.⁽⁴⁹⁻⁵⁷⁾

Em nosso meio, Bonduki et al.⁽⁵⁴⁾, em 2011, encontraram um aumento das taxas de cesárea. Não houve nenhum outro risco obstétrico maior, sugerindo que gestação após embolização arterial dos miomas é possível sem significativa morbidade ou mortalidade.

A EAM foi associada ao aumento de alguns desfechos obstétricos adversos, mas não outros, sendo necessários maiores estudos. Uma metanálise que incluiu 227 gestações após EAM em nove principais estudos observacionais, dentre os quais um ensaio randomizado, compararam gestações em grupos pareados por idade das pacientes e localização dos miomas. Gestações após EAM apresentaram aumento significativo das taxas de abortamentos (35% versus 17%, *odds ratio* 2,8).

Em termos de fertilidade, os estudos da EAM até o presente momento, não apresentam resultados significativos. Dados disponíveis sugerem um impacto de moderado a mínimo na fertilidade.

Miomas, particularmente aqueles submucosos, podem afetar a fertilidade por interferir na implantação. É incerto se a terapêutica dos miomas com EAM tem um impacto benéfico na fertilidade.⁽³³⁾

Estudos moleculares do endométrio pós-EAM são escassos e somente nas duas últimas décadas esses fatores locais foram estudados. Os estudos são realizados por técnicas de PCR-array, onde são avaliadas as expressões gênicas e suas relações clínicas.

Neste estudo, selecionamos um grupo de mulheres com leiomioma, uniforme quanto aos sintomas e idade, e colhemos amostra do endométrio na segunda fase do ciclo menstrual para analisarmos a expressão de genes pré e pós-EAM. Os genes são responsáveis pelo controle da produção de proteínas e observamos subexpressão MMP 3, sem variação estatisticamente significativa da MMP10.

A homogeneidade quanto ao volume do útero, apresentação espacial dos nódulos, índice de massa corpórea, raça, regime hormonal, paridade, tabagismo, dentre outros são dificuldades no desenvolvimento de trabalhos com leiomioma uterino. Isto é minimizado nos resultados, quando notamos uma ação uniforme do tratamento por EAM, refletido através do decréscimo volumétrico semelhante entre todas as pacientes (média da taxa de redução de 36,6%).

Outra característica importante foi o envolvimento de pacientes nuligestas e outras com antecedentes de gestação, dessa forma, podemos afastar a

presença de características particulares das pacientes com infertilidade primária, que influenciariam os resultados do estudo.

O fato de obtermos pouca quantidade de RNA extraídos de cada amostra não nos permitiu avaliar cada paciente isoladamente e nos fez decidir por montar dois grupos por “pool” de RNA, um pré (controle) e o outro, 6 meses pós-EAM (pareamento). Esses grupos foram quantificados e, após confirmação da sua relação de pureza do RNA, foi possibilitada a expressão gênica e a comparação pré e pós embolização.

Na análise da expressão gênica do endométrio, encontramos, em nosso estudo, uma subexpressão estatisticamente significativa em relação ao gene MMP3 pré e pós-embolização. Não houve variação estatisticamente significativa para MMP10.

Genes das metaloproteinases estão relacionados com o favorecimento da implantação embrionária⁽⁵⁸⁻⁶⁵⁾ e, em nosso estudo, observamos subexpressão desses elementos 6 meses pós-EAM para MMP3.

As MMP, como exposto, têm o papel de favorecimento na reorganização endometrial e proliferação celular. Portanto, diante de nossos resultados, pressupomos que a MEC está em remodelação tecidual. Nos parece aceitável aceitar a hipótese que não há uma piora na função endometrial após seis meses da embolização.

A implantação, invasão e placentação são processos moleculares complexos, que envolvem várias outras moléculas e interações enzimáticas pouco conhecidos e não muito elucidados até o momento. Novos estudos devem ser realizados para tal afirmação.

Mais trabalhos prospectivos, randomizados, com maior casuística, com grupo controle, ainda precisam ser feitos para se avaliar o impacto real da EAM na reparação endometrial e no processo inflamatório.

6 CONCLUSÕES

- Foi identificada uma diminuição estatisticamente significativa da expressão do gene MMP3 pós- EAM, em relação às amostras pré-procedimentos.
 - Não houve variação estatisticamente significativa da expressão do gene MMP10 pré e pós-EAM.
-

ANEXO 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 4 de novembro de 2011

CEP Nº: 1246/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): FRANCO LOEB CHAZAN

Disciplina/Departamento: Ginecologia Endócrina

Pesquisadores associados: Claudio Bonduki (orientador)

Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Análise de fatores endometriais de implantação embrionária e de viabilidade das células endometriais em pacientes submetidas a embolização arterial para tratamento do leiomioma uterino :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo com intervenção terapêutica

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:

OBJETIVO DO ESTUDO: O objetivo deste estudo é avaliar fatores endometriais de implantação e viabilidade celular em pacientes submetidas a tratamento de embolização para leiomioma uterino

RESUMO: Serão incluídas 30 mulheres atendidas no Setor de Embolização de Mioma Uterino da Disciplina de Endocrinologia Ginecológica e Climatério do Departamento de Ginecologia da Unifesp. Serão mulheres com idade entre 25-40 anos, portadoras de leiomiomas sintomáticos (com alterações menstruais, algia pélvica, sensação de peso em baixo ventre, sintomas compressivos nos tratos gastro-intestinal e gênito-urinário) e/ou infertilidade, desejosas em manter o útero. As pacientes serão submetidas à embolização arterial do mioma uterino após assinar termo de consentimento. Após o procedimento, as amostras de endométrio serão obtidas através de biopsia realizadas na fase lútea (20-24 dia do ciclo) através de cureta de Novak antes da EUA e 6 meses após o procedimento. As amostras citológicas assim obtidas serão conservadas em -80 C até posterior extração de RNA. Para avaliação das proteínas de implantação (mucina I e integrina) faremos extração de RNA para PCR.

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos, que serão realizados por equipe especializada.

TCLE: Apresentado adequadamente

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 29/10/2012 e 24/10/2013

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Titulo do Projeto: "ANÁLISE DE FATORES ENDOMETRIAIS DE IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS ENDOMETRIAIS EM PACIENTES SUBMETIDAS A EMBOLIZAÇÃO ARTERIAL PARA TRATAMENTO DO LEIOMIOMA"

O mioma uterino é considerado a doença benigna mais frequente do órgão genital feminino na idade reprodutiva. Esta patologia (doença) é dependente de hormônio (estrógeno) e acomete preferencialmente mulheres entre 30 e 40 anos e, é cerca de nove vezes mais frequente na raça negra. O leiomioma pode ser classificado de acordo com a sua localização em: subseroso, quando localizado externamente ao miométrio; intramural, quando situado no miométrio; e submucoso, quando situado internamente ao miométrio, podendo até invadir a cavidade uterina. A sintomatologia está diretamente relacionada com a localização, número e tamanho tumoral. Em se tratando de leiomiomas subserosos, a sensação de peso e desconforto abdominal são predominantes. A indicação do tratamento baseia-se se os miomas ocasionam sintomas ou se tem comportamento de crescimento rápido no decorrer do tempo. A decisão da melhor opção de tratamento dependerá da localização, número e tamanho dos miomas; do desejo reprodutivo; do desejo de conservação do útero e das repercussões clínicas devido o sangramento, entre outras. O tratamento conservador pode ser expectante, medicamentoso, cirúrgico (miomectomias) e a Embolização das Artérias Uterinas (EAU). Uma das indicações do tratamento conservador do mioma uterino é de manter a capacidade reprodutiva. Tanto a miomectomia como a embolização arterial podem criar fatores para infertilidade.

Os principais fatores de infertilidade que podem aparecer com estes tratamentos são os peritoneais e os endometriais. Estamos fazendo este estudo para avaliar proteínas de implantação e vitalidade celular endometrial em pacientes submetidas a tratamento de embolização para leiomioma uterino, com o objetivo de avaliar se o tratamento de embolização pode influenciar para uma futura gestação.

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesse estudo.

As mulheres que serão incluídas nesse estudo serão aquelas atendidas no Setor de Embolização de Mioma Uterino do Departamento de Ginecologia da UNIFESP-EPM onde participarão da rotina de atendimento do serviço.

Alem disso, realizarão entrevistas e exames. Os exames a serem realizados são necessários para o seu tratamento e fazem parte da rotina do ambulatório. Após a confirmação da certeza da necessidade de tratamento nos colheremos, com uma cureta, algumas células de dentro do seu útero.

Poderá existir benefício para o seu tratamento na dependência dos resultados desse estudo. A sua participação no estudo é totalmente voluntária e caso deseje, você poderá

se retirar do estudo a qualquer momento, sem nenhuma necessidade de justificativa e sem nenhum prejuízo em seu tratamento que continuara sendo realizado normalmente.

Todas as informações colhidas e as identidades das pacientes serão mantidas em sigilo como informação confidencial. Não existem despesas pessoais para você em qualquer fase do nosso estudo, incluindo exames e consultas. Também não existira compensação financeira relacionada a sua participação.

A nossa equipe de pesquisadores se compromete a utilizar os dados e material coletados somente para esta pesquisa.

Estamos a sua disposição para qualquer informação relacionada a pesquisa ou qualquer problema relacionado a ela. Em qualquer etapa do estudo, a paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa (Dr. Franco L. Chazan) que pode ser encontrada no Ambulatório de Embolização de Mioma Uterino localizado na Rua Embaú, 66, Vila Clementino, São Paulo, SP ou na Secretaria do Departamento de Ginecologia na Rua Napoleão de Barros 715, 7º andar do Hospital São Paulo (telefone 5579.3321). Caso você tenha alguma dúvida ou consideração com relação aos aspectos éticos da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Botucatu, 572 - 1º andar - cj 14, tel 5571-1062, Fax: 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa denominada:

"ANÁLISE DE FATORES ENDOMETRIAIS DE IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS ENDOMETRIAIS EM PACIENTES SUBMETIDAS A EMBOLIZAÇÃO ARTERIAL PARA TRATAMENTO DO LEIOMIOMA"

Discuti com a responsável pelo estudo (Dr. Franco L. Chazan) sobre minha decisão em participar dessa pesquisa. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de benefícios que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse serviço.

Assinatura da Paciente/representante legal - Data e local:

Assinatura de testemunha - Data e Local:

8 REFERÊNCIAS

-
1. Munro MG. et al. The FIGO classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years. *Fertil Steril*. 2011;95(7):2204-8, 2208.e1-3. ISSN 1556-5653. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21496802>>.
 2. Gupta S, Jose J, Manyonda I. Clinical presentation of fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2008 Aug;22(4):615-26.
 3. Wallach EE, Vlahos NF. Uterine myomas: an overview of development, clinical features and management. *Obstet Gynecol*. 2004;104(2):393-406.
 4. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. Consenso Nacional sobre Miomas Uterinos. 2017.
 5. Haney AF. Clinical decision making regarding: What we need in the next millennium. *Env Health Perspec*. 2000;108:supplement 5.
 6. Borgfeldt C, Andolf E. Transvaginal ultrasonographic findings in the uterus and the endometrium: low prevalence of leiomyoma in a random sample of women age 25-40 years. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000;79(3):202-7.
 7. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol*. 1990;94:435-8.
 8. Stewart EA, Cookson CL, Gandolfo RA, Schulze-Rath R. Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. *Br J Obstet Gynaecol*. 2017;124:1501-12.
 9. Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Jan;188(1):100-7. PubMed PMID: 12548202.
 10. American College of Obstetricians and Gynecologists. Choosing the Route of Hysterectomy for Benign Disease. Committee Opinion, Number 701, *Obstet Gynecol*. 2017:129 e 155-9.
 11. Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS).
 12. Stewart EA. Uterine fibroid. Overview of treatment of uterine leiomyomas (fibroids) 2011.
 13. Marsh EE, Ekpo GE, Cardozo ER, Brocks M, Dune T, Cohen LS. Racial differences in fibroid prevalence and ultrasound findings in asymptomatic young women (18-30 years old): a pilot study. *FertilSteril*. 2013 Jun;99(7):1951-7. Epub 2013 Mar 15.
 14. Parker WH. Etiology and diagnosis of uterine myomas. *FertilSteril*. 2007;87(4):725-36.
-

-
15. Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology*. 2010;151(6):2433-42.
 16. Gomes MT, Castro R de A, Villanova FE, da Silva ID, Baracat EC, de Lima GR, Girão MJ. The progesterone receptor gene polymorphism, PROGINS, maybe a factor related to the development of uterine fibroids. *FertilSteril*. 2007;87(5):1116-21.
 17. Marcotte-Bloch C, Novellas S, Buratti MS, Caramella T, Chevallier P, Bruneton JN. Torsion of a uterine leiomyoma: MRI features. *Clin Imaging*. 2007;31(5):360-2.
 18. Parker WH. The utility of MRI for the surgical treatment of women with uterine fibroid tumors. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(1):31-6.
 19. Duelhom M, Lundorf E, Hansen ES, Ladertoug S, Olensen F. Accuracy of magnetic resonance imaging and transvaginal ultrasonography in the diagnosis, mapping and measurement of uterine myiomas. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186:409-15.
 20. Duelhom M, Lundorf E, SorensenJS, Ledetoug S, Olensen F, Laurensen H. Reproducibility of evaluation of the uterus by transvaginal sonography, hysterosonographic examination, hysteroscopy and magnetic resonance imaging. *Hum Reprod*. 2002;17:195-200.
 21. Rajan DK, Margau R, Kroll RR, Simons ME, Tan KT, Jaskolka JD, Kachura JR, Sniderman KW, Beecroft JR, Haider M. Clinical utility of ultrasound versus magnetic resonance imaging for deciding to proceed with uterine artery embolization for presumed symptomatic fibroids. *Clin Radiol*. 2011;66(1):57-62.
 22. Lethaby A, Ivanova V, Johnson NP. Total versus subtotal hysterectomy for benign gynaecological conditions. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(2):CD004993.
 23. Viswanathan M, Hartmann K, McKoy N, Stuart G, Rankins N, Thieda P, Lux LJ, Lohr KN. Management of uterine fibroids: an update of the evidence. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 2007;(154):1-122.
 24. Lethaby A, Augood C, Duckitt K. Non steroidal anti-inflammatory drugs for heavy menstrual bleeding. *The Cochrane database of systematic reviews* (2002).
 25. Kjerulff KH, Langenberg PW, Rhodes JC, Harvey LA, Guzinski GM. Effectiveness of hysterectomy. *Obstet Gynecol*. 2000; 95(3):319-26.
-

-
26. Donnez J, Courtoy GE, Donnez O, Dolmans MM. Ulipristalacetate for the management of large uterine fibroids associated with heavy bleeding: a review.-*Reprod Biomed Online*. 2018 Aug;37(2):216-23.
 27. Alelez JP. Single-stage total hysteroscopic myomectomies: indications, techniques and results. *Fertil Steril*. 1995;63:703-8.
 28. Vercellini P, Maddalena S, DeGiorgio O, Aimi G, Crosignani PG. Abdominal myomectomy for infertility: a comprehensive review. *Hum Reprod*. 1998;13:873-9.
 29. Ravina JH, Herbreteau D, Ciraru-Vigneron N, et al. Arterial embolisation to treat uterine myomata. *Lancet* 1995; 346:671.
 30. Gupta JK, Sinha A, Lumsden MA, Hickey M. Uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014;CD005073.
 31. Chrisman MB, Saker RK, Ryu AA, Nemcek Jr. The impact of uterine fibroid embolization on resumption of menses and ovarian function. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2000;Pages 699-703.
 32. Spies JB, Cornell C, Worthington-Kirsch R, Lipman JC, Benenati JF. Long-term outcome from uterine fibroid embolization with tris-acrylgelatin microspheres: results of a multicenter study. *J Vasc Interv Radiol*. 2007;18(2):203-7.
 33. Van der Kooij SM, Bipat S, Hehenkamp WJ, Ankum WM, Reekers JA. Uterine artery embolization versus surgery in the treatment of symptomatic fibroids: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2011.
 34. Messina ML, Bozzini N, Halbe HW, Pinotti JA. Uterine artery embolization for the treatment of uterine leiomyomata. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;79(1):11-6.
 35. FEBRASGO - Manual de Orientação de Cirurgia Endovascular em Ginecologia e Obstetrícia, 2011.
 36. Hilario SG. (Catálogo USP). Avaliação da expressão gênica relacionada à receptividade endometrial em pacientes submetidos à embolização do mioma uterino. Tese [Doutorado] - São Paulo, 2012.
 37. Torre A, Fauconnier A, Kahn V, Limot O, Bussières L, Pelage JP. Fertility after uterine artery embolization for symptomatic multiple fibroids with no other infertility factors. *Eur Radiol*. 2017;27:2850-9.
 38. Tropeano G, Di Stasi C, Amoroso S, Gualano MR, Bonomo L, Scambia G. Long-term effects of uterine fibroid embolization on ovarian reserve: a prospective cohort study. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2296-300.
-

-
39. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003;200(4):423-8.
 40. Zhao Y, Zhang W, Wang S. The expression of estrogen receptor isoforms alpha, beta and insulin-like growth factor-I in uterine leiomyoma. *Gynecol Endocrinol.* 2008;24(10):549-54.
 41. Sternlicht MD, Werb Z. How Matrix Metalloproteases Regulate Cell Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2001;17:463-516.
 42. Perez N, Ostojić S, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Reprod Biomed Online.* 2012;24(5):567-75.
 43. Bernardo A. Expressões gênicas da matriz extracelular e citocinas em tecido endometrial antes e após embolização das artérias uterinas para tratamento do leiomioma. Tese. 2013. Universidade Federal de São Paulo.
 44. Hulboy D, Rudolph L, Matrisian L. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:27-45.
 45. Katsumori T, Nakajima K, Tokuhira M. Gadolinium-Enhanced MR imaging in the evaluation of uterine fibroids treated with uterine artery embolization. *AJR Am J Roentgenol.* 2001;177(2):303-7.
 46. McCluggage WG, Ellis PK, McClure N, Walker WJ, Jackson PA, Manek S. Pathologic features of uterine leiomyomas following uterine artery embolization. *Int J Gynecol Pathol.* 2000;19(4):342-7.
 47. Ravina JH, Merland JJ, Ciraru-Vigneron N, Bouret JM, Herbret EAMD, Houdart E, Aymard A. Arterial embolization: a new treatment of menorrhagia in uterine fibroma. *Presse Med.* 1995;24(37):1754.
 48. Ravina JH, Ciraru-Vigneron N, Aymard A, Le Dref O, Merland JJ. Pregnancy after embolization of uterine myoma: report of 12 cases. *Fertil Steril.* 2001;73:1241-3.
 49. Poppe W, Van Assche FA, Wilms G, Favril A, Baert A. Pregnancy after transcatheter embolization of a uterine arteriovenous malformation. *Am J Obstet Gynecol.* 1987;156(5):1179-80.
 50. Pearl ML, Braga CA. Percutaneous transcatheter embolization for control of life-threatening pelvic hemorrhage from gestational trophoblastic disease. *Obstet Gynecol.* 1992;80(3 Pt 2):571-4.
-

-
51. Ravina JH, Merland JJ, Herbret EAMD, Houdart E, Bouret JM, Medelenat P. Preoperative embolization of uterine fibroma. Preliminary results (10 cases). *Presse Med.* 1994;29;23(33):1540.
 52. Ochi H, Suginami H, Matsubara K, Taniguchi H, Yano J, Matsuura S. Micro-bead embolization of uterine spiral arteries and changes in uterine arterial flow velocity wave forms in the pregnancyewe. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1995;6(4):272-6.
 53. McLucas B, Goodwin S, Adler L, Rappaport A, Reed R, Perrella R. Pregnancy following uterine fibroid embolization. *Int J Gynaecol Obstet.* 2001;74(1):1-7.
 54. Bonduki CM, Gonçalves P, Yokohama C, Costa OF, Baracat EC, Lima GR, Girão MJBC. Gravidez e parto pós-EAM arterial para tratamento de leiomioma uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006;28(10):596-600.
 55. Usadi RS, Marshburn PB. The impact of uterine arteryembolization on fertility and pregnancy outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007;19(3):279-83.
 56. Spies JB, Cornell C, Worthington-Kirsch R, Lipman JC, Benenati JF. Long-term out come from uterine fibroid embolization with tris-acryl gelatin microspheres: results of a multicenter study. *J Vasc Interv Radiol.* 2007;18(2):203-7.
 57. Galves JA, McCarthy S, Weinreb J, Zeltermann D, White RI, Pollak J, Tal MG. Comparison of MRI outcomes of uterine artery embolization for uterine leiomyoma using tris-acryl gelatin microspheres, polyvynil alcohol spheres, and polyvynil alcohol particles. *J Comput Assist Tomogr.* 2008 May-Jun;32(3):356-61.
 58. Ace CI, Okulicz WC. Microarrayprofilingofprogesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secret oryphase. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;7:2:54.
 59. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, et al. Decidual stromal cell response toparacrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod.* 2007;76(1):102-17.
 60. Zhao Y, Zhang W, Wang S. The expression of estrogen receptor isoforms alpha, beta and insulin-like growth factor-I in uterine leiomyoma. *Gynecol Endocrinol.* 2008;24(10):549-54.
 61. Dunlap KA, Erikson DW, Burghardt RC, White FJ, Reed KM, et al. Progesterone and placentation increase secreted phosphoproteinone (SPP1orosteopontin) in uterine glandsandstroma for histotrophic and hematotrophic support of ovinepregnancy. *Biol Reprod.* 2008;79(5):983-90.
-

62. Zhao Y, Zhang W, Wang S. The expression of estrogen receptor isoforms alpha, beta and insulin-like growth factor-I in uterine leiomyoma. *Gynecol Endocrinol*. 2008;24(10):549-54.
 63. Catherino WH, Malik M, Driggers P, Chappel S, Segars J, Davis J. Novel, orally active selective progesterone receptor modulator CP8947 inhibits leiomyoma cell proliferation without adversely affecting endometrium or myometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;122(4):279-86.
 64. Kannan A, Fazleabas AT, Bagchi IC, Bagchi MK. The transcription factor C/EBP β is a marker of uterine receptivity and expressed at the implantation site in the primate. *Reprod Sci*. 2010;17(5):434-43.
 65. Altmäe S, Reimand J, Hovatta O, Zhang P, Kere J, Laisk T, Saare M, Peters M, Vilo J, Stavreus-Evers A, Salumets A. Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. *Mol Endocrinol*. 2012;26(1):203-17.
 66. Perez N, Ostojić S, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(5):567-75.
-